



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 07 531 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
C 12 N 9/02
C 07 K 14/435

⑦ Aktenzeichen: 100 07 531.2
② Anmeldetag: 18. 2. 2000
④ Offenlegungstag: 6. 9. 2001

DE 100 07 531 A 1

⑦ Anmelder:
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e.V., 80636 München, DE

⑦ Vertreter:
Gleiss & Große, Patentanwaltskanzlei, 70469
Stuttgart

⑦ Erfinder:
Vitzthum, Frank, 71157 Hildrizhausen, DE;
Bernhagen, Jürgen, Dr., 72074 Tübingen, DE;
Bisswanger, Hans, Prof.Dr., 72411 Bodelshausen,
DE; Brunner, Herwig, Prof.Dr., 70569 Stuttgart, DE

⑤ Entgegenhaltungen:
Nakamura, M. u. Yamazaki, J.: Salts Induced
Oxidase
Activity of Lipoamide Dehydrogenase from Pig
Heart. In: Eur. J. Biochem., 1979, Vol.96, S.417-
422;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤ Biotechnologisch interessante Proteine aus Katzenhaien

⑤ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein mit der
Aktivität einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus
Katzenhaien sowie Verfahren desselben und Verwendun-
gen derselben.

DE 100 07 531 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft aus Katzenhaien gewonnene Proteine, Verfahren zu deren Gewinnung sowie deren Verwendung in biotechnologisch interessanten Anwendungsgebieten.

Dihydroliponamid-Dehydrogenasen (E. C.: 1.8.1.4; vormalig 1.6.4.3) gehören zur Gruppe der Oxidoreductasen (E. C.: 1), wie beispielsweise die Glutathion-Reductase (E. C.: 1.6.4.2), die Thioredoxin-Reductase (E. C.: 1.6.4.5), die NADPH-Cytochrom-P-540-Reductase (E. C.: 1.6.2.4), die Quecksilber II-Reductase (E. C.: 1.16.1.1) oder die Trypanothion-Reductase (E. C.: 1.6.4.8). Dihydroliponamid-Dehydrogenasen spielen eine bedeutende Rolle als E₂-Untereinheit in den Pyruvat-, 2-Oxoglutarat- und Verzweigketten-2-Oxosäure-Dehydrogenase-Komplexen (Sokatch et al., J. Bacteriol. (1981), 148, 647). Dihydroliponamid-Dehydrogenasen sind außerdem an der reversiblen, oxidativen Decarboxylierung von Glycin beteiligt (Kochi und Kikuchi, Arch. Biochem. Biophys. (1976), 173, 71 und Robinson et al., J. Biol. Chem. (1973), 248, 5319). Überdies liegen Hinweise vor, dass der Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *Butyrivibrio rutherfordii* eine metabolische Rolle bei der NAD-abhängigen Umwandlung von Lactat zu Pyruvat zukommt (Wittenberg und Haaf, J. Bacteriol. (1964), 88, 896). Des weiteren wird angenommen, dass freie Dihydroliponamid-Dehydrogenase in Mitochondrien aus Rattenleber als Transhydrogenase (Olson und Allgyer, J. Biol. Chem. (1973), 248, 1582 und Olson und Allgyer J. Biol. Chem. (1973) 248, 1590) wirkt. Zudem konnte gezeigt werden, dass Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus Schweineherz NADH-Oxidase-Aktivität aufweist (Nakamura und Yamazaki, Eur. J. Biochem. (1979) 96, 417). Im physiologischen Bereich liegt die Funktion der Dihydroliponamid-Dehydrogenasen auch in der Oxidation beziehungsweise Reduktion von Dihydroliponsäure (DHLS; 6,8-Dimercapto-Octansäure) beziehungsweise Liponsäure (LS; 1,2-Dithiolan-3-Pentansäure) sowie der entsprechenden Amide mittels NAD beziehungsweise NADH. In einer biologischen Zelle befindet sich freie LS im Gleichgewicht mit ihrer reduzierten Form, der DHLS. Die Einstellung dieses Gleichgewichtes wird durch die Dihydroliponamid-Dehydrogenase beschleunigt. Es handelt sich hierbei also um ein intramolekulares Redoxsystem, vergleichbar mit dem des oxidierten und reduzierten Glutathion. Da die DHLS oxidiertes Glutathion zu reduzieren vermag, sind beide Systeme offensichtlich gekoppelt. Auch Disulfidbrücken in Proteinen können durch die DHLS reduziert werden. Außerdem fungiert die DHLS als Radikalfänger und übt auch indirekt die Wirkung eines Antioxidans aus, da sie Vitamin C regeneriert und dieses auch die Wirkung von Vitamin E verstärkt (Scott et al., Free Radic. Res. (1994), 20, 119). Durch das Abfangen von Sauerstoffradikalen wird die Lipidperoxidation reduziert, so dass die Schädigung von Membranen vermindert wird. Ein protektiver Einfluss auf Nucleinsäuren und Proteine ist demnach ebenfalls zu erwarten. Dieser Einfluss kann sich positiv bei der Prävention beziehungsweise Therapie von Krebs und AIDS auswirken (Packer und Suzuki, Mol. Aspects Med. (1993), 14, 229).

Das Racemat der LS wird heute schon als Therapeutikum bei verschiedenen Krankheiten eingesetzt. Es findet Verwendung bei der Behandlung von Diabetes mellitus, Lebercirrhose, Polyneuritis, Arteriosklerose, Lactatacidose und Schwermetallvergiftungen. Mindest ebenso erfolgversprechend scheint der Einsatz von DHLS beziehungsweise der entsprechenden Amide zu sein.

Dihydroliponamid-Dehydrogenasen stellen also Proteine dar, die nicht nur wissenschaftlich, sondern auch wirtschaft-

lich interessante Anwendungen ermöglichen. Einerseits ermöglichen Untersuchungen an Dihydroliponamid-Dehydrogenasen, die als stammesgeschichtlich alte Proteine anzusehen sind, entwicklungsgeschichtliche Analysen. Andererseits ermöglichen Dihydroliponamid-Dehydrogenasen die Synthese enantiomeren-reiner beziehungsweise enantiomerenangereicherter LS- beziehungsweise DHLS-Derivate, die wiederum eine Reihe von pharmazeutisch interessanten Anwendungen eröffnen.

Dihydroliponamid-Dehydrogenasen sind aus einer Reihe von Organismen bekannt, beispielsweise wie schon erwähnt aus Schweineherz (Nakamura und Yamazaki, a. a. O.), aus *Azotobacter vinelandii* (Mattevi et al., J. Mol. Biol. (1991), 220, 975), aus *Pseudomonas putida* (Mattevi et al., Proteins, (1992), 13, 336), oder aus *Butyrivibrio rutherfordii* (Wittenberg und Haaf a. a. O.). Aus Vitzthum und Bisswanger (Biological Chemistry (1997), 378, 103) ist auch eine Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus dem Großgefleckten Katzenhai (*Scyliorhinus stellaris*) bekannt. Aufgrund der komplexen und vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Dihydroliponamid-Dehydrogenasen besteht jedoch ein ständiger Bedarf an weiteren Proteinen mit derartiger enzymatischer Aktivität, um diese gezielt unter bestimmten Bedingungen oder für bestimmte Anwendungen einsetzen zu können. So ist es für bestimmte Anwendungen wichtig, dass derartige Enzyme auch bei niedrigen Temperaturen hohe spezifische Aktivitäten aufweisen, um beispielsweise eine aufwendige kostenintensive Thermostatisierung der katalysierten Reaktion zu vermeiden.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher das technische Problem zu Grunde, weitere Dihydroliponamid-Dehydrogenasen zur Verfügung zu stellen, die neue oder erweiterte Anwendungsmöglichkeiten für derartige Proteine eröffnen sowie neue Verwendungen für derartige Proteine aufzeigen.

Die vorliegende Erfindung löst dieses Problem durch die Bereitstellung eines isolierten und gereinigten, insbesondere vollständig oder partiell gereinigten, Proteins mit der Aktivität einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase, wobei das Protein als Homodimer mit einer relativen Molekülmasse von circa 100 bis 150 kDa (bestimmt durch Gelfiltration) und einer relativen Molekülmasse der Untereinheiten von circa 50 kDa (bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Maldi-TOF) vorliegt und erhältlich ist durch (i) das Herstellen eines Rohextraktes aus Muskulaturgewebe von *Scyliorhinus canicula* (*S. canicula*), (ii) das anschließende Durchführen einer Gelfiltration über eine Superdex®-Säule und (iii) das Durchführen einer Anionenaustausch-Chromatographie. Die Erfindung löst das Problem auch durch die Bereitstellung eines vorgenannten Verfahrens zur Herstellung des vorgenannten Proteins. Schließlich löst die Erfindung das ihr zu Grunde liegende Problem auch durch die Bereitstellung der Verwendung eines Proteins mit der Aktivität einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus Katzenhaien, insbesondere eines Proteins der vorgenannten Art, als Diaphorase.

Das erfindungsgemäße Protein aus *S. canicula* zeichnet sich in vorteilhafter Weise durch ein besonders niedrig liegendes Temperaturmaximum und hohe spezifische Aktivitäten auch bei niedrigen Temperaturen aus. Aufgrund der hohen spezifischen Aktivität auch bei niedrigen Temperaturen laufen Reaktionen, beispielsweise auch bei Raumtemperatur, ausgesprochen schnell ab. Demgemäß entfällt eine aufwendige Thermostatisierung von durch das erfindungsgemäße Protein katalysierten Reaktionen bei entsprechend hohen Temperaturen, so dass Kosten reduziert werden können. Das erfindungsgemäße Protein weist trotz des niedrigen Temperaturmaximums eine relativ hohe Temperaturstabilität auf und kann überdies in vorteilhafter Weise reversibel in

seiner Enzym-Aktivität durch die Temperatur reguliert werden, gleichsam also als "Temperatur-Schalter" wirken. Die Aktivität des vorliegenden Enzyms kann nämlich durch eine Erhöhung der Temperatur unterbunden beziehungsweise gestoppt oder vermindert werden. Aufgrund der hohen Temperaturstabilität werden die erfindungsgemäßen Proteine jedoch beim Absinken der Temperatur wieder enzymatisch aktiv. Dies erlaubt in vorteilhafter Weise eine reversible Kontrolle und Steuerung von Reaktionen durch die Temperatur; ab circa 40°C nimmt die Aktivität ab, bei ungefähr 70°C ist die Aktivität annähernd Null. Die Enzym-Aktivität ist bis ungefähr 60°C vorhanden und ab ungefähr 50°C ist das Protein nicht mehr aktiv. In dem Bereich zwischen 50 bis 60°C ist das Protein in einem sogenannten Zwischenbereich. Erst wenn eine Inkubation des Proteins bei sehr hohen Temperaturen für einen längeren Zeitraum stattfindet, wird das Protein irreversibel denaturiert und dann auch bei niedrigen Temperaturen enzymatisch inaktiv.

Das erfindungsgemäße Protein besitzt ferner eine lange Halbwertszeit und kann demnach auch über längere Zeiträume, auch unter ambienten Bedingungen, gelagert werden.

Aufgrund der relativ hohen Temperaturstabilität des Proteins, können gängige mesophile Expressionssysteme zur in vivo Herstellung des Proteins verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Protein erweist sich als besonders vorteilhaft hinsichtlich seiner Stereoselektivität bei der Umsetzung und Bildung von R- und S-Enantiomeren, beispielsweise bei der Liponsäure, und ermöglicht demgemäß die Herstellung enantiomeren-reiner und enantiomerenangereicherter Substanzen oder Substanzgemische, insbesondere der R-Form. So können gezielt und unter vorteilhaften Bedingungen pharmazeutisch interessante Produkte hergestellt werden.

Die Erfindung stellt ferner eine neue und überraschende Verwendung von Dihydroliponamid-Dehydrogenasen aus Katzenhaien bereit, gemäß der diese Proteine als Diaphorase eingesetzt werden. Demgemäß können die Katzenhai-Proteine mit der Aktivität einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase, insbesondere aus *Scyliorhinus stellaris* oder *S. canicula* als Enzyme eingesetzt werden, welche eine Pyridinnucleotid-abhängige Reduktion beziehungsweise Oxidation von synthetischen und natürlichen Elektronenakzeptoren beziehungsweise -donatoren, zum Beispiel Farbstoffen, katalysieren und damit in vorteilhafter Weise einem direkten oder indirekten enzymatischen Nachweis von Substanzen dienen können. Die erfindungsgemäße Verwendung eröffnet damit ein weiteres Einsatzspektrum für Katzenhai-Dihydroliponamid-Dehydrogenasen als Diaphorasen, die beispielsweise in Redoxsystemen die Untersuchung unterschiedlichster Reaktionen in visuellen Spektralbereichen ermöglichen. Erfindungsgemäß kann beispielsweise vorgesehen sein, die Dihydroliponamid-Dehydrogenasen aus Katzenhaien, insbesondere das Protein der vorliegenden Erfindung, an Avidin oder Nucleinsäuren bestimmter Sequenz chemisch zu binden, so dass Stoffe, die an diese Substanzen binden, wie beispielsweise Nucleinsäuren mit komplementärer Sequenz oder Biotin beziehungsweise Biotin-Derivate nachgewiesen werden können.

Erfindungsgemäß kann durch eine Quervernetzung mehrerer Dihydroliponamid-Dehydrogenasen die Empfindlichkeit solcher Enzymsubstratkomplexe stark erhöht werden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem Protein mit der Aktivität einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase ein Protein verstanden, welches in der Lage ist, mittels NAD(P) beziehungsweise NAD(P)H DHLS beziehungsweise LS, deren Amine und Derivate, zu oxidieren beziehungsweise zu reduzieren.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem Protein mit der Aktivität einer Diaphorase ein Enzym verstanden, welches in der Lage ist, eine Pyridinnucleotid-abhängige Reduktion beziehungsweise Oxidation von künstlichen und/oder natürlichen Elektronenakzeptoren beziehungsweise -donatoren wie Farbstoffen zu katalysieren, insbesondere in Abhängigkeit von NAD(P)H beziehungsweise NAD(P).

Unter einer Superdex®-Säule wird eine Gelfiltrations-säule verstanden, die ein hydrophiles perlförmiges Polymerisat mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 13 µm aus quervernetzter Agarose und Dextran enthält, insbesondere mit einem Trennbereich für globuläre Proteine von 10 bis 600 kDa.

Die Erfindung stellt also eine neue Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E. C. 1.8.1.4) aus *S. canicula* bereit, welche durch die relative Molekülmasse des als Homodimer vorliegenden Gesamtproteins und die relative Molekülmasse der einzelnen Untereinheiten sowie spezielle zu ihrer Isolierung führende Verfahrensschritte gekennzeichnet ist. Selbstverständlich erfasst die Erfindung aber auch Isoenzyme, Mutanten, Derivate, funktionelle Äquivalente oder Abwandlungen dieses Proteins, sofern diese im wesentlichen die genannten Aktivitäten und Eigenschaften aufweisen und mittels des beschriebenen Herstellverfahrens angereichert werden können. Die Erfindung erfasst zum Beispiel auch Fusionsproteine, die das vorliegende Protein oder Fragmente des erfindungsgemäßen Proteins ganz oder teilweise enthalten. Die Erfindung erfasst auch Proteine, die nur eine oder mehrere der Untereinheiten des vorliegenden Proteins enthalten, gegebenenfalls zusammen mit Untereinheiten anderer Herkunft und/oder Struktur beziehungsweise Funktion. Die Erfindung erfasst insbesondere auch die erfindungsgemäßen Proteine, wobei diese Derivatisierungen wie Glycosylierungen, Acetylierungen, gebundene Lipidgruppen oder ähnliches aufweisen. Die Erfindung erfasst auch die vorgenannten Proteine, wobei diese mit anderen Molekülen verbunden sind, wie Nucleinsäuren, Avidin oder ähnlichem.

Die Erfindung erfasst selbstverständlich auch Antikörper oder deren Fragmente, insbesondere monoclonale und polyclonale Antikörper, die spezifisch gegen das erfindungsgemäße Protein oder Teile davon gerichtet sind und diese spezifisch erkennen und binden können. Die Erfindung betrifft auch gegen die vorgenannten Antikörper gerichtete Antikörper.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfasst die Erfindung ein vorgenanntes Protein, wobei dieses Protein aus Parietalmuskulatur aus *S. canicula* gewonnen wurde.

Die erfindungsgemäße Herstellung eines Rohextraktes erfolgt in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dadurch, dass Muskulatur, insbesondere Parietalmuskulatur, aus *S. canicula* entnommen wird und zu Pulver zerkleinert, zum Beispiel zermörsert wird, insbesondere in flüssigem Stickstoff. Anschließend wird das Pulver, insbesondere das gefrorene Pulver, mit einer vorzugsweise gleichen Menge an Aufschlusslösung vermengt und unter Schütteln bei gegenüber Raumtemperatur erhöhter Temperatur für einen definierten Zeitraum inkubiert, insbesondere 5 bis 30, zum Beispiel 10, Minuten bei mindestens 60°C, vorzugsweise 70 bis 90°C, insbesondere 80°C. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation, insbesondere eine Zentrifugation über 10 Minuten, beispielsweise mit 16000 g bei 4°C. In besonders bevorzugter Ausführungsform wird der so gewonnene Rohextrakt, also der nach Zentrifugation erhaltene Überstand, für die anschließende Gelfiltration und Anionenauschromatographie zur Isolierung und Gewinnung des erfindungs-

gemäßen Proteins verwendet.

Die Gelfiltration erfolgt mit einer Superdex®, insbesondere einer Superdex 200®-Gelfiltrationssäule, also einer Säule, die über kovalente Bindungen mit einer Agarosematrix gekoppelte Dextranketten aufweist und bei einer durchschnittlichen Partikelgröße von 13 µm einen Trennbereich für globuläre Proteine von 10 bis 600 kDa bereitstellt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Anionentauschchromatographie, insbesondere eine Mono Q®-Anionentauschchromatographie, mittels monodispersen hydrophilen Polymerpartikeln mit einer Größe von ungefähr 10 µm, die quartäre Ammoniumgruppen tragen, bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform zum Waschen und/oder zur Elution 10 mM Kaliumphosphat pH 7 verwendet wird. Das Eluat enthält das gereinigte Protein in wässriger Lösung, welches entweder so weiterverwendet oder aufkonzentriert werden kann.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann im Anschluss an die Anionentauschchromatographie eine weitere Konzentrierung des gewonnenen Enzyms durch Ultrafiltration stattfinden, beispielsweise durch Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 6000xg, bis das Konzentrat das gewünschte Volumen aufweist.

Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit der Aktivität einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *S. canicula*, wobei in einem ersten Schritt ein Rohextrakt aus Muskulaturgewebe, insbesondere Parietalmuskulaturgewebe, aus *S. canicula* hergestellt wird, insbesondere nach dem vorgenannten Verfahren zur Herstellung eines Rohextraktes, in einem zweiten Schritt eine Gelfiltration mit einer Superdex®-Säule, insbesondere einer Superdex® 200-Säule, und in einem dritten Schritt eine Anionentauschchromatographie durchgeführt wird, der sich gegebenenfalls eine Ultrafiltration anschließen kann.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung eines Proteins mit der Aktivität einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus Arten der Familie der Katzenhaie, insbesondere aus *S. stellaris* und *S. canicula*, als Proteine mit der Aktivität einer Diaphorase, beispielsweise in Kits und Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Substanzen, zum Beispiel gekoppelten optischen Tests. Die erfindungsgemäße Verwendung eröffnet für die genannten Dihydroliponamid-Dehydrogenasen ein erweitertes Anwendungsspektrum, insofern als dass diese Proteine die Reduktion beziehungsweise Oxidation von synthetischen und/oder natürlichen Elektronenakzeptoren oder -donatoren, insbesondere Farbstoffen, in Pyridinnucleotid-abhängigen Reaktionen ermöglichen. Die dabei vorzugsweise im visuellen Spektralbereich gebildeten Farbstoffe ermöglichen den Nachweis unterschiedlichster Substanzen, wie Aminosäuren, Proteine, insbesondere Enzyme, Nucleinsäuren, Cofaktoren etc. Die genannten Dihydroliponamid-Dehydrogenasen können daher in den verschiedensten analytischen Systemen, zum Beispiel in gekoppelten Enzymsubstrattests eingesetzt werden, wobei die nachzuweisenden Substanzen selbst Substrate der Diaphorase sein können, aber auch Substrate anderer Enzyme, die durch Kopplung des Redoxsystems eines solchen Enzyms mit dem der Diaphorase die Untersuchung solcher Reaktionen im visuellen Spektralbereich ermöglichen. Beispielsweise wird durch die Kopplung von zum Beispiel Avidin an Diaphoresen der Nachweis von Biotinderivaten ermöglicht.

Demgemäß betrifft die Erfindung auch Verfahren zur oxidativen oder reduktiven Umsetzung eines Substrates zu einem Farbstoff oder der Bildung eines Produktes aus einem Farbstoff, wobei das Substrat oder der Farbstoff mit minde-

stens einem Pyridinnucleotid, zum Beispiel NAD(P)/NAD(P)H, und einem Protein mit der Aktivität einer Diaphorase aus Katzenhaien, insbesondere dem Protein der vorliegenden Erfindung, unter reduzierenden oder oxidierenden Bedingungen zu einem Farbstoff oder Produkt umgesetzt und nachgewiesen wird. Das Substrat kann dabei, insbesondere in einem Nachweisverfahren, eine nachzuweisende Substanz sein oder über eine weitere Enzym-Substratverbindung mit einer nachzuweisenden Substanz gekoppelt sein. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist ein Farbstoff ein Substrat, das nach Oxidation beziehungsweise Reduktion seine spektralen Eigenschaften im visuellen Spektralbereich ändert, insbesondere die Stoffe 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium (INT); 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT); 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP); Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT); Flavinmononucleotid (FMN); 4-[-3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat (WST-1); 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilid (XTT). Andere Substrate sind zum Beispiel Liponsäurederivate sowohl Racemate beziehungsweise Enantiomere, wie auch LS, LA, DHLs, DHLA, Lipoylreste, 1,2-Dithiolan-3-capronsäure, Bisnorliponsäure, Tetranorliponsäure, insbesondere LS-Amide, die bessere Substrate als die freien Säuren sind, da beispielsweise zumindest in den Enzymkomplexen das eigentliche Substrat säureamidgebundene LS ist. Weitere andere Substrate sind auch Pyridinnucleotide, wie beispielsweise α NAD, β NAD, α NADH, β NADH, α NADPH, β NADPH, α NADP, β NADP, Thio α NAD und Thio β NAD und andere.

Andere Substrate sind zum Beispiel Liponsäurederivate sowohl als Racemat beziehungsweise Enantiomer, wie auch LS, LA, DHLs, DHLA, Liponreste, 1,2-Dithiolan-3-capronsäure, Bisvorliponsäure, Tetranorliponsäure, insbesondere LS-Amide.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Die Erfindung wird anhand der Beispiele und der dazugehörigen Figuren näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 Eine graphische Darstellung der Superdex® 200 Gelfiltration des Rohextraktes von *S. canicula*. Die Proteinkonzentration (ausgefüllte Quadrate) wurde über die Bradford-Proteinbestimmung ermittelt. Des weiteren wurden die Fraktionen auf Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Volumenaktivität (*) untersucht.

Fig. 2 Eine graphische Darstellung der Mono Q®-Anionentauschchromatographie der vereinigten Gelfiltrationsfraktionen von *S. canicula*. Die Proteinkonzentration (ausgefüllte Quadrate) mit einem Maximum von 0,4 mg/ml, wurde über die Bradford-Proteinbestimmung ermittelt. Des weiteren wurden die Fraktionen auf Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Volumenaktivität (*) untersucht. Das Maximum betrug hier circa 1 U/µl. Die Konzentration der Lösung B (ausgefüllte Dreiecke) veränderte sich bei der Elution linear.

Fig. 3 Einen Maldi-TOF des Proteins mit Dihydroliponamid-Dehydrogenase- und Diaphorase-Aktivität aus *S. canicula*.

Fig. 4 Das pH-Optimum der Enzymaktivität des Proteins am Beispiel der Reduktion des DHLA durch das Protein aus *S. canicula*. Die Proteinmenge betrug hierbei circa 2 µg/ml. Die Reaktionen wurden bei einer Temperatur von circa 20°C durchgeführt.

Fig. 5 Das Temperaturmaximum der Enzymaktivität des Proteins am Beispiel der Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität des Proteins aus *S. canicula*. Die Proteinmenge betrug hierbei circa 2 µg/ml.

Fig. 6 Die Temperaturstabilität der Enzymaktivität des Proteins am Beispiel der Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität des Proteins aus *S. canicula* unter oxidierenden (ausgefüllte Quadrate, ausgefüllte Dreiecke) und reduzierenden (\square , Δ) Bedingungen bei 80°C (ausgefüllte Quadrate, \square) und 90°C (ausgefüllte Dreiecke, Δ).

Fig. 7 Faktoren der höheren spezifischen Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivitäten (liniert) und Diaphorase-Aktivitäten (kariert) des Proteins aus *S. canicula* im Vergleich zum Enzym aus Schweineherz. Die Proteinbestimmung erfolgte einmal nach Bradford (Bradford, Anal. Biochem., (1976), 72, 248), zum anderen fluorimetrisch nach Vitzthum (Vitzthum, et al., Anal. Biochem., (1999), 276, 59).

Beispiel 1

Gewinnung des Proteins mit der Aktivität einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *S. canicula*

A) Herstellung des Rohextraktes

Zur Herstellung des Rohextraktes wurde *S. canicula* Parietalmuskulatur entnommen und in flüssigem Stickstoff zu Pulver zermörsert. Anschließend wurde das noch gefrorene Muskelpulver mit der gleichen Menge an Aufschlusslösung (10 mM KPP (gleich Kaliumphosphatpuffer pH 7,5; 3 mM EDTA; 5 mM PMSF; 0,1 mM FAD) vermengt. Unter ständigem Mischen wurde die Probe bei 80°C 10 Minuten lang inkubiert. Daraufhin erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation mit 16000 g bei 4°C. Der resultierende Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet.

Zur Herstellung von Kaliumphosphatpuffer wurden Dikaliumhydrogenphosphat- und Kaliumdihydrogenphosphat-Lösungen gleicher Molarität im entsprechenden Verhältnis gemischt.

B) Superdex® 200 Gelfiltration

Zwischen 0,5 und 2 ml des unter A) hergestellten Rohextraktes wurden einer Gelfiltration mit einer Hi Load® 16/60 prep grade Gelfiltrationssäule und einem Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC) System der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) bei RT mit 10 mM KPP pH 7,5 und 3 mM EDTA und einer Flussrate zwischen 1 und 2 ml pro Minute unterzogen. Das Volumen der Fraktionen betrug etwa 2 ml. Fraktionen mit ausreichender Enzymaktivität wurden vereinigt (Fig. 1).

Bei der Superdex® 200 Gelfiltration wurde bezüglich des Rohextraktes und der spezifischen Aktivität eine Anreicherung von 22 ± 7 und eine Ausbeute bezüglich der Gesamtzymaktivität von $130\% \pm 20$ erreicht.

C) Mono Q®-Anionenauschromatographie

Mit den vereinigten Fraktionen der Gelfiltration gemäß B) wurde eine Anionenauschromatographie mit einer Mono Q® HR 5/5 Säule der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) bei RT (Raumtemperatur) durchgeführt. Unter einer Flussrate von 1 ml/min wurden circa 10 ml Probe appliziert, mit 5 ml Lösung A (10 mM KPP pH 7,5 und 3 mM EDTA) gewaschen, hiernach wird die Konzentration der Lösung B (10 mM KPP pH 7,5, 3 mM EDTA und 1 M NaCl) kontinuierlich, linear auf 100% erhöht, 100% waren nach 60 ml erreicht und anschließend wurden mit 10 ml einer 100%igen Lösung B eluiert. Es wurden Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Diejenigen mit ausreichender Enzymaktivität wurden vereinigt (Fig. 2).

Bei der Mono Q®-Anionenauschromatographie ergab sich die Anreicherung zu 1500 ± 600 und die Ausbeute zu $95\% \pm 12$.

- 5 D) Konzentrierung der vereinigten Fraktionen mit Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität der Mono Q®-Anionenauschromatographie durch Ultrafiltration.

Zur gegebenenfalls erwünschten Konzentrierung der vereinigten Fraktionen mit Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität der Mono Q®-Anionenauschromatographie gemäß C) wurden Ultrafree® 50 K Ultrafiltrationseinheiten der Firma Millipore GmbH (Eschborn, Deutschland) verwendet. Hierbei wurden die Proben bei RT mit 6000 g so lange zentrifugiert, bis das Konzentrat das gewünschte Volumen hatte.

Beispiel 2

- 20 Bestimmung der Reinheit des Haiproteins mit Dihydroliponamid-Dehydrogenase- und Diaphorase-Aktivität und der relativen Molekülmasse der Proteinuntereinheiten durch SDS-PAGE

Zur Durchführung einer SDS-PAGE wurden 12,5-prozentige homogene Gele und das Phast System® der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden mit der Probenauftragslösung im Verhältnis 1 : 1 verdünnt und auf das Gel aufgebracht (Sambrook, et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual). Die Proteinmenge des Rohextraktes betrug hierbei circa 17 µg. Da die Proteinkonzentrationen der vereinigten Fraktionen der chromatographischen Schritte sehr gering waren, mussten diese vor dem Auftrag auf das Gel mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge Typ Univapo 100 H der Firma Uni Equip Laborgerätektechnik und Vertriebs GmbH (Martinsried, Deutschland) konzentriert werden. Die Proteinmenge der Gelfiltrationsprobe betrug damit circa 7 µg, die des Mono Q®-Eluats sowie die des Konzentrates der Ultrafiltration circa 1 µg. Des weiteren wurden circa 4 µg "Protein Molecular Weight Standard" von 14,3 bis 200 kDa aufgetragen.

Die Färbung der Proteinbanden im Gel erfolgte über kolloidales Coomassie. Hierzu wurden die Proteine zunächst 15 bis 60 Minuten in 20% (v/v) Methanol oder Ethanol und 7 bis 8,5% (v/v) o-Phosphorsäure oder Essigsäure unter Schütteln bei RT fixiert. Zur Färbung wurden die Gele in 20% (v/v) Methanol oder Ethanol und 20% (v/v) Roti®-Blue überführt und bei Raumtemperatur so lange geschüttelt, bis die Färbung vollständig war. Anschließend wurde in 25% (v/v) Methanol oder Ethanol entfärbt, danach in 20 g Ammoniumsulfat pro 100 ml Wasser stabilisiert, und daraufhin das Gel in der Trocknerlösung mit 20% (v/v) Ethanol und 10% (v/v) Glycerol getrocknet.

Die zunehmende Reinheit der Proteine im Verlauf ihrer Reinigung und die Bestimmung der relativen Molekülmassen der Enzymuntereinheiten wurde durch vorstehend beschriebene SDS-PAGE untersucht (Probenauftragslösung: 0,2 M TRIS-HCl, pH 6,8; 6% SDS, 20% Glycerol; 1% DTT; 0,1 mg Bromphenolblau und Orange G). Die Auswertung der SDS-PAGE ergab für das Protein aus *S. canicula* eine relative Molekülmasse der Untereinheiten im Bereich von circa 50 kDa. Damit lag die relative Molekülmasse der Untereinheit des Proteins aus *S. canicula* über der aus *S. stellaris*, die im Bereich von 45 kDa liegt.

Das aus Vitzthum und Bisswanger (a. a. O.) bekannte Protein stammt daher nicht, wie dort irrtümlich angegeben, aus *S. canicula*, sondern aus *S. stellaris*. *S. canicula* unter-

scheidet sich morphologisch nämlich kaum von *S. stellaris*. *S. stellaris* kann als ausgewachsenes Tier eine Länge von etwas mehr als einen Meter erreichen, während *S. canicula* nur etwa 80 cm lang wird. Nicht ausgewachsene Tiere sind daher schwer zuzuordnen, da die Pigmentierung starken Variationen unterliegt. Mittels des in Vitzthum und Bisswanger (a. a. O.) beschriebenen Verfahrens lässt sich aus *S. canicula* kein Protein mit der Aktivität einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase isolieren, sondern nur aus *S. stellaris*.

Beispiel 3

Bestimmung der relativen Molekülmasse der Proteinuntereinheiten durch Massenspektrometrie

Neben der Bestimmung der relativen Molekülmasse der Untereinheiten des Proteins aus *S. canicula* über die SDS-PAGE wurde eine Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie durchgeführt. Hierzu wurden die vereinigten Fraktionen der Mono Q[®]-Anionenaustauschchromatographie mittels Ultrafree[®] 5 K Ultrafiltrationseinheiten der Firma Millipore GmbH Eschborn, Deutschland) konzentriert und in das Lösungsmittel Wasser überführt. Als Matrix fungierte Sinapinsäure. Die Massenspektrometrie wurde mit einem Gerät der Firma Hewlett Packard durchgeführt. Die relative Molekülmasse einer Untereinheit ergab sich zu circa 50 kDa (Fig. 3).

Beispiel 4

Bestimmung der relativen Molekülmasse des Hairoteins aus *S. canicula*

Über eine Eichung mit einem Proteinstandard wurde die relative Molekülmasse des Proteins aus *S. canicula* durch dessen Elutionsvolumen (V_e) bei der Superdex[®] 200 Gelfiltration des Rohextraktes bestimmt. Mit dem Ausschlussvolumen (V_o) und dem Säulenvolumen (V_s) ergab sich nach:

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_o)}{(V_s - V_o)},$$

für das Haienzym ein K_{av} von circa 0,34, aufgrund dessen die relative Molekülmasse etwa zwischen 100 und 150 kDa liegt. Aufgrund der vorstehend beschriebenen SDS-PAGE und MALDI-TOF Untersuchungen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem vorliegenden Proteins um ein Homodimer handelt.

Beispiel 5

Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften des Proteins gemäß Beispiel 1 sowie der Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *S. stellaris*

Enzymaktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte mit dem Spektrophotometer Lambda 2 der Firma Perkin Elmer/Applied Biosystems GmbH (Langen, Deutschland). Des weiteren wurden spezielle Mikrotiterplattensysteme zur Bestimmung von Enzymaktivitäten über Extinktionskoeffizienten mit dem Mikrotiterplattenreader 3550 der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) eingesetzt.

Bestimmung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität

Zum einen wurde bei den Enzymtests die durch Dihydroliponamid-Dehydrogenasen katalysierte Reduktion der LS mit NADH und einem Proton unter Bildung von R/S-Dihydroliponsäure (DHLS) und NAD ausgenutzt. Die Testmischung bestand hierbei aus 0,93 mM EDTA, 0,68 mg/ml BSA, 0,2 mM NADH und 0,3 mM NAD in 0,1 M KPP pH 5,9 (6,7). Nach Zugabe der Probe wurde die Reaktion mit LS gestartet. Statt NADH wurde auch NADPH und Thio-NAD verwendet. Außerdem wurden Liponsäureamide untersucht. Es wurden jeweils Racemate als auch Enantiomere eingesetzt.

Zum anderen wurde bei einem weiteren Enzymtest zur Bestimmung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität die enzymkatalysierte Oxidation von DHLS oder des R/S-Dihydroliponsäureamids (DHLSA) durch NAD unter Bildung von LS oder R/S-Liponsäureamid (LA), NADH und einem Proton verwendet. In der Regel wurde hierbei eine DHLS- beziehungsweise DHLSA-Konzentration von 5 mM und eine NAD-Konzentration von 2 mM in 0,1 M Kaliumphosphatlösung (KPP) pH 7,6 eingesetzt. Gestartet wurde die Reaktion bei 25°C nach Zugabe der Probe durch DHLS beziehungsweise DHLSA. Die Herstellung der DHLS des DHLSA erfolgte mittels Reduktion von LA durch Natriumborhydrid.

Die Bildung beziehungsweise der Verbrauch von NADH wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt. Über die Absorptionsänderung mit der Zeit wurde anhand einer Zeit-Umsatz-Kurve die Reaktionsgeschwindigkeit über den molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten des NADH bei 340 nm von $6,22 \text{ (mMcm)}^{-1}$ ermittelt. Hierzu wurde das Tangentenverfahren zur Bestimmung der Anfangssteigung angewendet und die Volumenaktivität berechnet. Die Angabe der Volumenaktivität erfolgte in U/l. Eine Enzymeinheit (Unit, U) ist definiert als Umsatz von 1 µmol Substrat beziehungsweise Produkt pro Minute. Die spezifische Aktivität berechnete sich aus dem Quotienten der Volumenaktivität und Proteinkonzentration der Probe.

Da der Umsatz des NADH bei 340 nm verfolgt wurde, musste überprüft werden, ob der Dithiolanring der reduzierten LS beziehungsweise des Amids einen signifikanten Beitrag zur Absorption in diesem Bereich leistete. Hierzu wurde das Absorptionsmaximum und der relative dekadische Absorptionskoeffizient des Dithiolanrings im relevanten Wellenlängenbereich bestimmt. Die Spektren des DHLSA sowie der LS, beide in Aceton gelöst, wurden aufgezeichnet. Der Dithiolanring absorbierte maximal bei 337 nm mit einem relativen molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten von $0,09 \pm 0,0008 \text{ (mMcm)}^{-1}$. Dies entsprach 1,4 Prozent des relativen molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten von NADH bei 340 nm. Somit konnte der Einfluss des Dithiolanrings bei der Bestimmung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität vernachlässigt werden.

Bestimmung der Diaphorase-Aktivität

Die Reduktion des 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium (INT) wurde über die Bildung des bei 492 nm maximal absorbierenden INT-Formazans mit einem molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten von $19,4 \text{ (mMcm)}^{-1}$ verfolgt. Die Konzentrationen des Standardtests betrugen 0,45 mM NAD, 0,4 mM NADH, 0,13 mM bis 1,5 mM INT und wahlweise 15 µM BSA in 0,1 M KPP pH 8. Des weiteren wurden gegebenenfalls 0,2 µM Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) eingesetzt. Die Bestimmung der Diaphorase-Aktivität erfolgte entsprechend der der Dihy-

droliponamid-Dehydrogenase-Aktivität. Außerdem wurden MTT, XTT, BCIP und NBT im mM-Konzentrationsbereich untersucht.

Bei der Ermittlung der Enzymaktivitäten bei verschiedenen pH-Werten wurde im Bereich zwischen 5 und 8 mit 0,1 M KPP gearbeitet, zwischen 7 und 9 mit 0,1 M Tris-HCl und zwischen 3 und 12 mit Theorell-Stenhagen-Lösung. Zur Herstellung dieser Lösung wurden 100 ml 0,33 M Citronensäure, 100 ml 0,33 M o-Phosphorsäure, 3,54 g Borsäure und 343 ml 1 N NaOH gemischt, der pH-Wert mit konzentrierter HCl bei RT eingestellt und auf 11 aufgefüllt.

Das Protein aus *S. canicula* wurde wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt. Das Protein aus *S. stellaris* wurde wie in Vitzthum und Bisswanger (a. a. O.) beschrieben aus *S. stellaris*-Gewebe hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym aus *S. stellaris* schon im Rohextrakt eine Diaphoraseaktivität von 3 U/mg aufweist.

A) pH-Abhängigkeit der Dihydroliponamid-Dehydrogenase- und Diaphoraseaktivität der Haiproteine aus *S. canicula* und *S. stellaris*

Die Oxidation der LS beziehungsweise der Amide durch beide Haienzyme verlief bei einem pH-Wert von etwa 6 optimal. Das pH-Optimum der Reduktion des DHLA lag etwa zwischen 7 und 8 (Fig. 4). Bei der Reduktion des INT ergab sich für beide Enzyme ein vergleichbares pH-Optimum. Die pH-Stabilität der Proteine war zwischen einem pH-Wert von 5 und 9 hoch.

B) Temperaturabhängigkeit der Dihydroliponamid-Dehydrogenase- und Diaphoraseaktivität des Haiproteins aus *S. canicula*

Temperaturmaximum

Das Temperaturmaximum der Enzymaktivität des vorliegenden Haiproteins lag etwa zwischen 30 und 50°C, was am Beispiel der Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität des Enzyms aus *S. canicula* deutlich wurde (Fig. 5).

Temperaturstabilität

Das Haiprotein besaß auch bei vergleichsweise hohen Temperaturen enorme Stabilität. Am Beispiel der Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität des Enzyms aus *S. canicula* zeigt sich, dass trotz des vergleichsweise geringen Temperaturmaximums sogar bei 80°C noch eine hohe Temperaturstabilität vorhanden war. Unter reduzierenden Bedingungen mit 1 mM DTT nahm die Temperaturstabilität im besonderen bei 90°C im Vergleich zu oxidierenden Bedingungen deutlich ab (Fig. 6).

C) Stereoselektivität

Beide Haiproteine, sowohl das aus *S. canicula* als auch ein gemäß Vitzthum und Bisswanger (a. a. O.) gereinigtes Protein aus *S. stellaris* besaßen Stereoselektivität bezüglich ihrer Substrate. Hierbei kommt es beispielsweise zu einem 20-fach höheren Umsatz eines Enantiomers, nämlich des R-Enantiomers, gegenüber dem anderen. Dies kann beispielsweise zur stereoselektiven Herstellung von Liponsäure beziehungsweise Dihydroliponsäure und der entsprechenden Amide ausgenutzt werden. Beispielsweise kann auch die selektive Bindung eines Substratenantiomers durch die Proteine zur Herstellung enantiomerenreiner Pharmaka ausgenutzt werden.

D) Vergleich der enzymatischen Aktivitäten der Haiproteine mit der Schweineherzdiaphorase

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten bei Raumtemperatur ergab für die Proteine aus *S. stellaris* und *S. canicula* vergleichbare Werte. Im Gegensatz zur Schweineherzdiaphorase wurden beispielsweise beim Enzym aus *S. canicula* deutlich höhere Aktivitäten ermittelt (Fig. 7).

Patentansprüche

1. Protein mit der Aktivität einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase, wobei das Protein als Homodimer mit einer relativen Molekülmasse von circa 100 bis 150 kDa (bestimmt durch Gelfiltration) und einer relativen Molekülmasse der Untereinheiten von circa 50 kDa (bestimmt durch SDS-PAGE) vorliegt und erhältlich ist durch (i) Herstellen eines Rohextraktes aus Muskulaturgewebe von *Scyliorhinus canicula*, (ii) Durchführen einer Gelfiltration unter Verwendung einer Superdex®-Säule und (iii) Durchführen einer Anionenauschromatographie.
2. Protein nach Anspruch 1, wobei das Muskulaturgewebe Parietalmuskulaturgewebe ist.
3. Protein nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Rohextrakt hergestellt wird durch Pulverisieren des Muskulaturgewebes, Auflösen in einer Aufschlusslösung, Inkubation der so erhaltenen Lösung über einen Zeitraum von 5 bis 30 Minuten bei mindestens 60°C, vorzugsweise 70 bis 90°C, und anschließende Zentrifugation.
4. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die bei der Anionenauschromatographie verwendete Säule mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer gewaschen und/oder eluiert wird.
5. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei im Anschluss an die Anionenauschromatographie eine Ultrafiltration durchgeführt wird.
6. Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit der Aktivität einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase, wobei in einem ersten Schritt ein Rohextrakt aus Muskulaturgewebe von *Scyliorhinus canicula* hergestellt, in einem zweiten Schritt eine Gelfiltration unter Verwendung einer Superdex®-Säule und in einem dritten Schritt eine Anionenauschromatographie durchgeführt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Anionenauschromatographie mit einer Mono Q®-Anionenauschromatographie durchgeführt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, wobei das Muskulaturgewebe Parietalmuskulaturgewebe ist.
9. Verfahren nach Anspruch 6 bis 8, wobei der Rohextrakt hergestellt wird durch Pulverisieren des Muskulaturgewebes, Auflösen in einer Aufschlusslösung, Inkubation der so erhaltenen Lösung über einen Zeitraum von 5 bis 30 Minuten bei mindestens 60°C, vorzugsweise 70 bis 90°C, und anschließende Zentrifugation.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, wobei im Anschluss an die Anionenauschromatographie eine Ultrafiltration durchgeführt wird.
11. Verwendung eines Proteins mit der Aktivität einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus Arten der Familie *Scyliorhinidae* als Diaphorase.
12. Verfahren zur oxidativen oder reduktiven Umsetzung eines Substrates zu einem Farbstoff, wobei das Substrat zusammen mit mindestens einem Pyridinnucleotid und einem Protein mit der Aktivität einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus Arten der Familie *Scyliorhinidae*, insbesondere einem Protein nach ei-

nem der Ansprüche 1 bis 5, unter reduzierenden oder oxidierenden Bedingungen zu einem Farbstoff umgesetzt wird.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

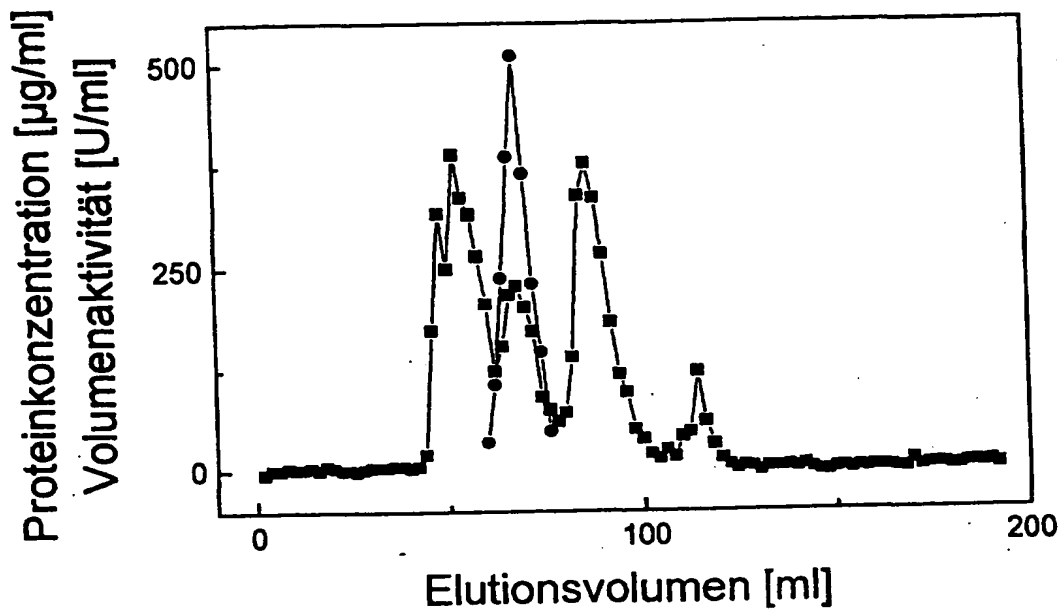
45

50

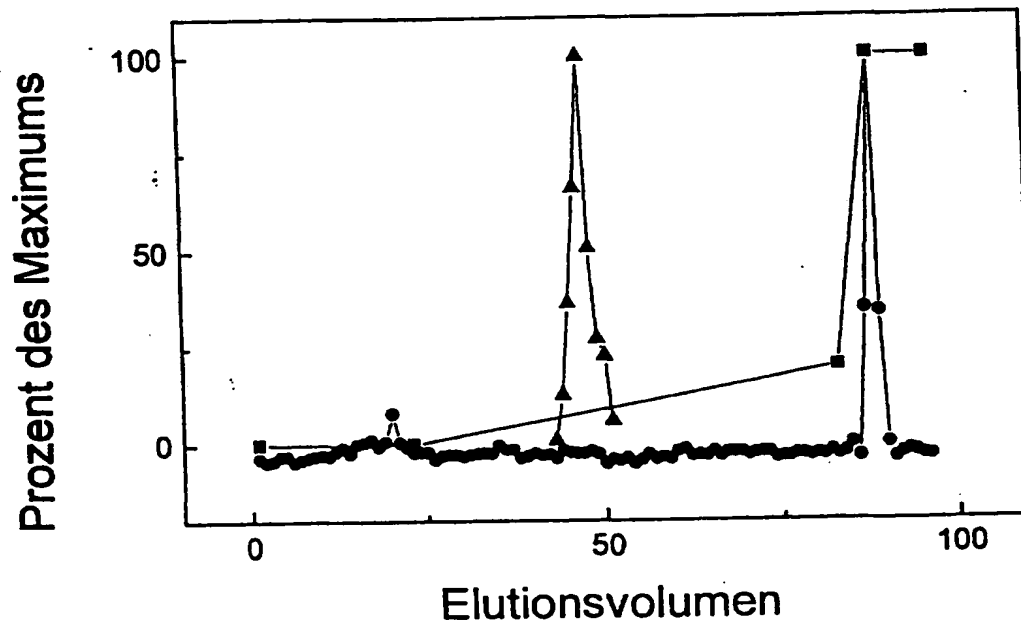
55

60

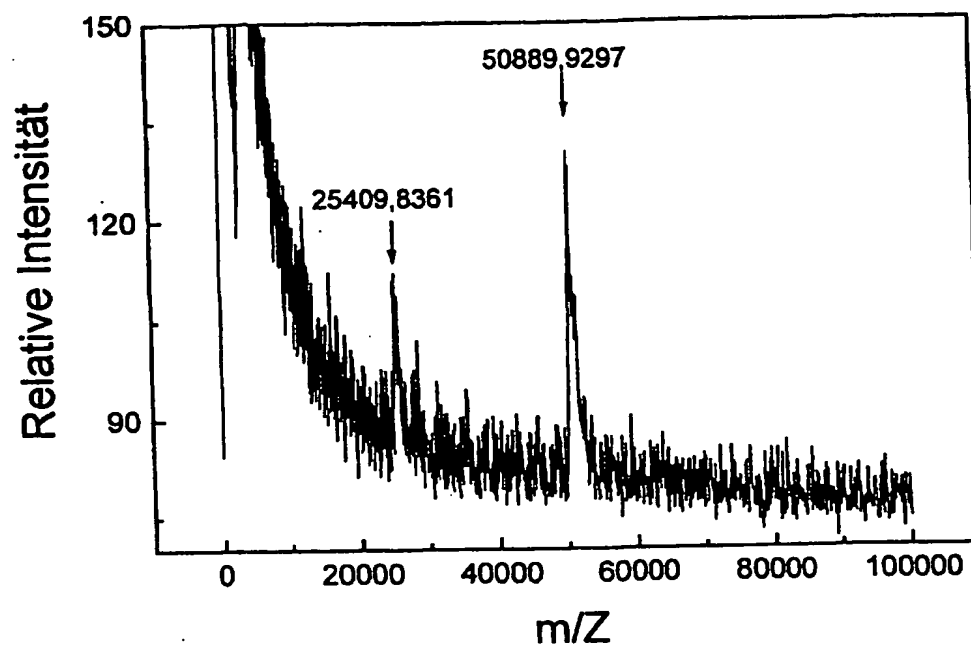
65



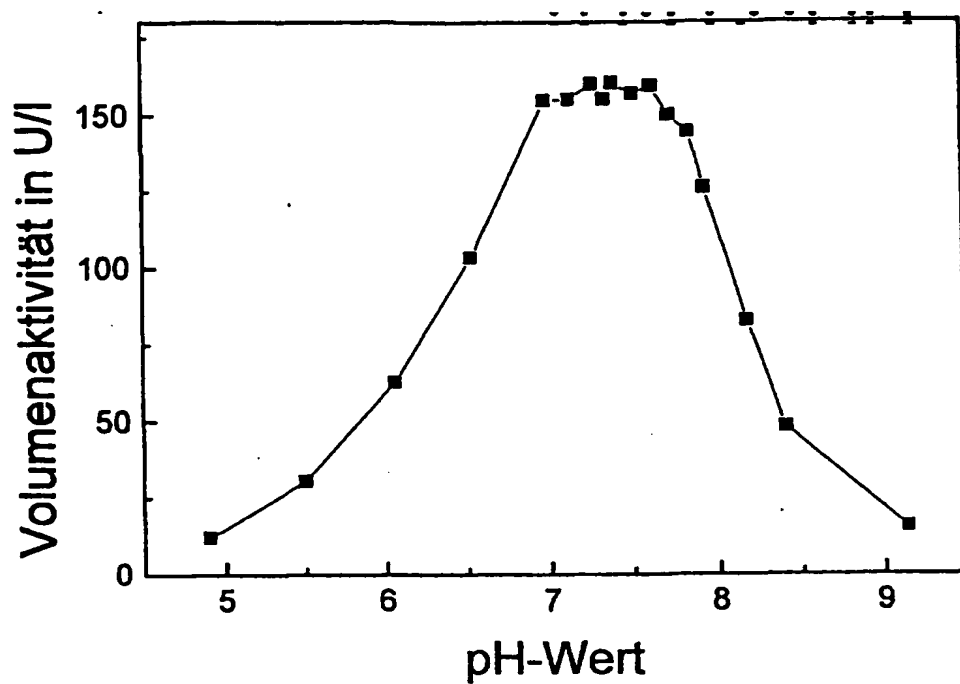
Figur 1



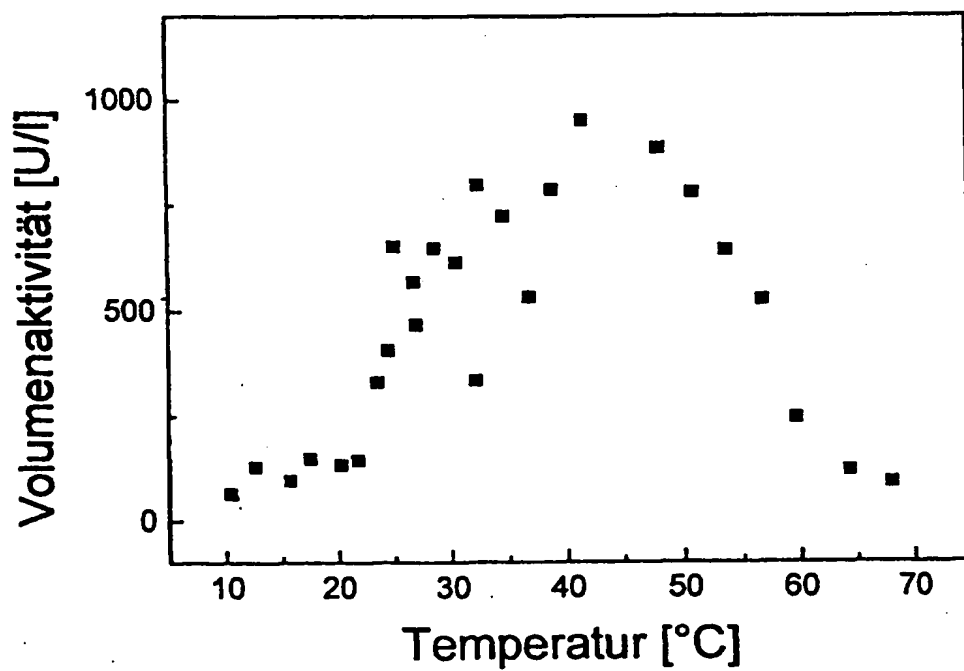
Figur 2



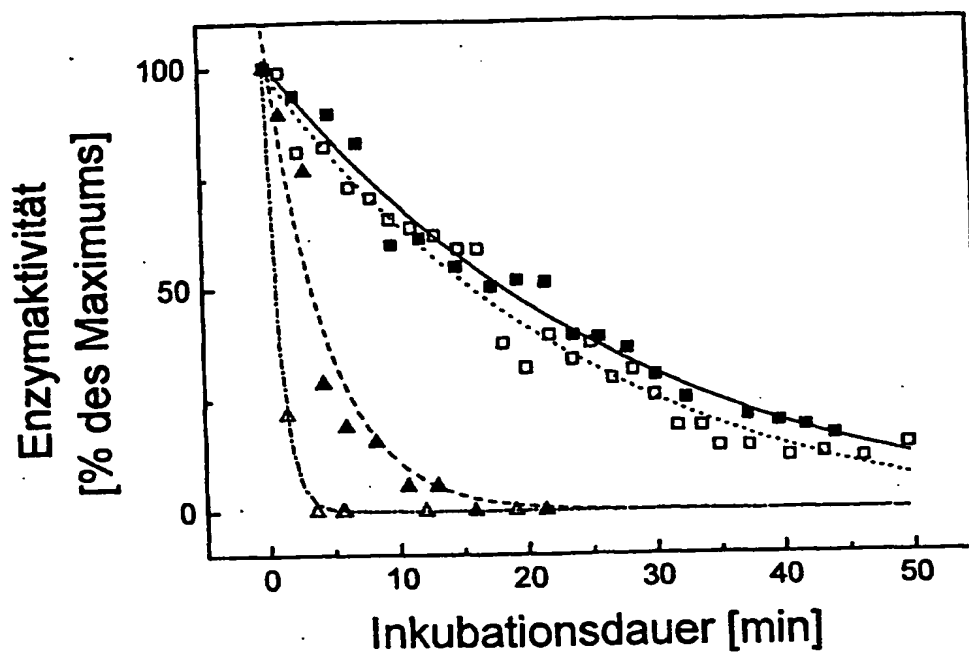
Figur 3



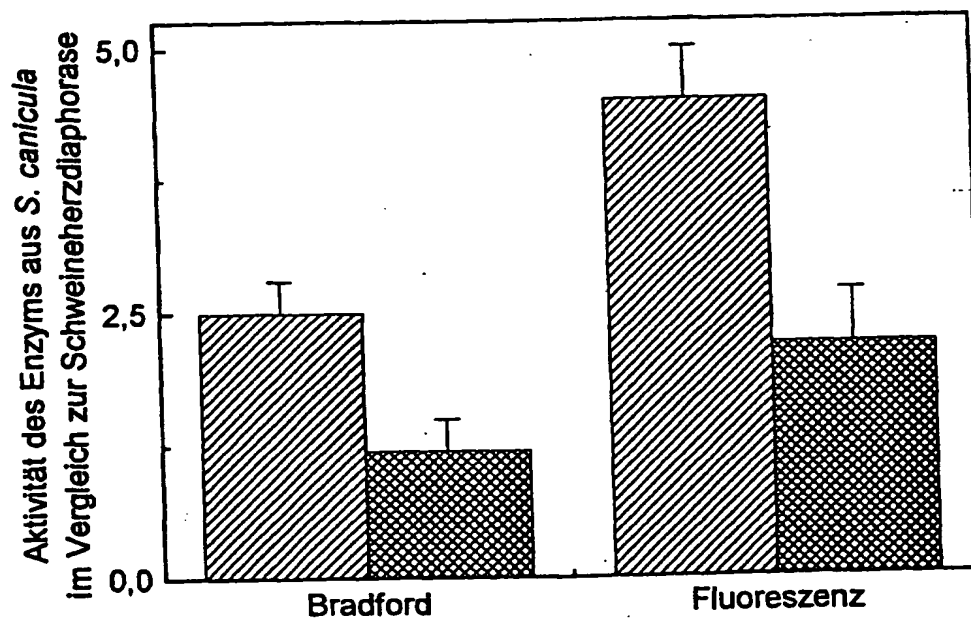
Figur 4



Figur 5



Figur 6



Figur 7